DANIELA SILVA SOUZA

COMPOSTOS INDÓLICOS COMO ATENUADORES DE DANOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE SOJA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa *Campus* de Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

RIO PARANAÍBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Rio Paranaíba

T
S729c
2017

Souza, Daniela Silva, 1991-
Compostos indólicos como atenuadores de danos do déficit hídrico em plantas de soja / Daniela Silva Souza. – Rio Paranaíba, MG, 2017.
vi, 28f : il. ; 29 cm.

Orientador: Willian Rodrigues Macedo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa-Campus Rio Paranaíba.
Inclui bibliografia.

1. Auxina. 2. Triptofol. 3. Estresse. I. Universidade Federal de Viçosa-Campus Rio Paranaíba. Instituto de Ciências Agrárias. Mestrado em Agronomia - Produção vegetal. II. Título.

633.34

DANIELA SILVA SOUZA

COMPOSTOS INDÓLICOS COMO ATENUADORES DE DANOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE SOJA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa *Campus* de Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de março de 2017.

_____
Liliane Evangelista Visôtto
(Coorientadora)

_____
Geraldo Humberto da Silva
(Coorientador)

_____
Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori

_____
Willian Rodrigues Macedo
(Orientador)

A Deus pela força e fé que me mantém viva e confiante na vida, trabalho, estudo e pesquisa.

Aos meus pais, Marlene e Gilmar, pelos ensinamentos de vida e constante apoio em meus estudos.

À minha amiga Maria Elisa, pela amizade e apoio nos momentos de dificuldade.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela vida, fé e também pela força em todos os momentos de ansiedade e cansaço.

Aos meus pais, pelo apoio concedido durante todos estes anos, bondade, generosidade, amor e nunca terem medidos esforços para o alcance de todos os meus objetivos.

À Maria Elisa, Diego, Tiago, Luana, Naiane, Flávio e Ana Paula pelo companheirismo e incentivo.

Ao Professor Dr. Willian Rodrigues Macedo, minha mais importante referência acadêmica, pela orientação, incentivo, exemplo, amizade, paciência durante a execução deste trabalho e por sempre caminhar junto e principalmente por acreditar em mim e em minha capacidade.

À Universidade Federal de Viçosa – *Campus* de Rio Paranaíba e ao Programa de Pós – Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, que me possibilitou a realização do curso de pós-graduação.

Aos meus co-orientadores Liliane Evangelista Visôtto e Geraldo Humberto da Silva, pelas orientações, conselhos e sugestões, os quais foram extremamente valiosos para o enriquecimento desse trabalho.

Aos professores membros da banca Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori, Liliane Evangelista Visôtto e Geraldo Humberto da Silva pela participação na banca de defesa.

Aos professores Pedro Ivo Vieira Good God e Vinícius Ribeiro Faria, por disporem de seu tempo em conversas, conselhos e ensinamentos.

A todos os professores e funcionários da instituição pelos ensinamentos transmitidos, apoio e coleguismo que contribuíram para a minha formação profissional.

Ao LAFIMEPRO pelo companheirismo, apoio e incentivo e auxílio na realização deste trabalho.

As minhas amigas de curso Ana, Isabella, Jéssica, Nayara, Thaisa, Samarina e aos demais colegas de mestrado e equipe pelo companheirismo, apoio e incentivo.

Aos técnicos Bruno, Jader, Roberta, Vander e Vinícius pela eficiência, disposição e colaboração na realização das análises.

ÍNDICE

RESUMO v
ABSTRACT vi
1. INTRODUÇÃO.....1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....5
3. RESULTADOS 13
4. DISCUSSÃO.....18
5. CONCLUSÕES 22
6. LITERATURA CITADA 23

RESUMO

SOUZA, Daniela Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – *Campus* de Rio Paranaíba, março de 2017. **Compostos indólicos como atenuadores de danos do déficit hídrico em plantas de soja.** Orientador: Willian Rodrigues Macedo. Coorientadores: Geraldo Humberto da Silva e Liliane Evangelista Visôtto.

Dentre os fatores abióticos o déficit hídrico (DH) pode ser considerado um dos mais limitantes à produtividade das plantas, o DH aciona mecanismos de defesa na tentativa de combater potenciais danos causados pela escassez hídrica, como, o hormônio vegetal auxina, que atua na sinalização celular, no controle da expansão e no crescimento. Neste estudo, objetivou avaliar a ação de dois compostos indólicos: auxina (Aux) e triptofol (Tol), aplicados antecipadamente ao estresse hídrico moderado, como promotores de tolerância em plantas de soja. Foram analisadas as trocas gasosas, enzimas antioxidantes, proteína total solúvel, extravasamento de eletrólitos, pigmentos, botões florais, massa seca, conteúdo mineral e nodulação radicular. Verificou-se que a 60% CC as plantas apresentaram diminuição significativa do teor de clorofila a, b, total, carotenoides, de assimilação de CO_2, do número e massa seca de vagens e no número de botões florais e aumentaram o dano nas membranas. Podendo concluir que, por se tratar de um genótipo altamente produtivo em condições ideais de cultivo, notou-se que o déficit hídrico foi prejudicial às plantas. O tratamento com Aux demonstrou melhor resultado para análise de botões florais, enquanto que em condição de estresse estes apresentaram redução. Para nodulação a Aux demonstrou-se superior em relação ao uso de Tol. Embora, sua aplicação antevendo o déficit hídrico não seja um mecanismo adequado de proteção.

ABSTRACT

SOUZA, Daniela Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – *Campus* de Rio Paranaíba, March, 2017. **Indol compounds as attenuators of damage in soybean plants under drought stress.** Adviser: Willian Rodrigues Macedo. Co-advisers: Geraldo Humberto da Silva and Liliane Evangelista Visôtto.

Among the abiotic factors, water deficit (DH) can be considered one of the most limiting to plant productivity, DH activates defense mechanisms in an attempt to combat potential damages caused by water scarcity, such as the vegetable hormone auxin, which acts on signaling Cellular, in control of expansion and growth. The objective of this study was to evaluate the action of two auxolic compounds: auxin (Aux) and tryptofol (Tol), applied in advance to moderate water stress, as tolerance promoters in soybean plants. Gaseous exchanges, antioxidant enzymes, total soluble protein, electrolyte extravasation, pigments, flower buds, dry matter, mineral content and root nodulation were analyzed. It was verified that at 60% FC plants showed a significant decrease in the content of chlorophyll a, b, total, carotenoids, CO_2 assimilation, number and dry mass of pods and in the number of flower buds and increased membrane damage. It can be concluded that, because it is a highly productive genotype under ideal growing conditions, it was noticed that the water deficit was detrimental to the plants. The treatment with Aux showed a better result for analysis of floral buds, while in stress condition these presented reduction. For nodulation, Aux was superior in relation to the use of Tol. Although its application in anticipation of the water deficit is not an adequate protection mechanism.

1. INTRODUÇÃO

Os fatores abióticos que mais limitam o crescimento e o sucesso reprodutivo dos vegetais são as temperaturas extremas, a seca e os solos salinos (Naser & Shani 2016), sendo que o déficit hídrico (DH) é o de maior ocorrência nas áreas agricultáveis do mundo, e o responsável por demandar maior esforço científico para manutenção das produtividades (Cattivelli et al. 2008).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das principais culturas agrícolas brasileiras, apresentando maior índice de crescimento. Segundo a Conab (2017), a estimativa é que a safra de soja 2016/2017 tenha obtido uma produção numa área de 33.787.000,2 hectares, alcançando uma produção acima de 103,8 milhões de toneladas distribuídas nas duas safras.

Entretanto, a soja é uma cultura relativamente sensível ao estresse hídrico, especialmente durante o período crítico de seu desenvolvimento (Hossain et al. 2014). Os estádios reprodutivos, tais como o início do florescimento (R1), início do enchimento da vagem (R5), pleno enchimento da vagem (R6) e a fase de germinação (Fehr & Caviness, 1977), são demasiadamente afetados pelo DH. Quando no florescimento, desencadeia o abortamento de flores, impedindo a antese, enquanto que, durante o período de produção e desenvolvimento das sementes, estas reduzem em número e em tamanho, devido ao encurtamento da duração desses estágios (Queiroz, 2014).

As plantas quando submetidas ao DH, acionam estratégias moleculares, bioquímicas, morfológicas e fisiológicas, que variam de acordo com a intensidade e duração do estresse, visando reduzir o efeito da baixa disponibilidade hídrica (Hossain et al. 2014). No entanto, há necessidade de maiores esclarecimentos quanto aos efeitos do estresse em determinados estádios de desenvolvimento da planta e intensidade desse.

Respostas fisiológicas, como a perda do turgor e ajustamento osmótico diminuem o potencial hídrico da folha, induzindo o fechamento dos estômatos. Desencadeando uma redução das trocas gasosas e consequente, diminuição da transpiração e da fotossíntese, limitando assim o crescimento e desenvolvimento da planta (Faghani et al. 2015).

A redução do processo fotossintético somado ao excesso de excitação de energia no fotosistema II leva ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando danos à planta. Para diminuir essas injúrias as plantas desenvolveram um sistema antioxidante altamente eficiente, constituído por enzimas, dentre elas a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) e, por substratos moleculares que neutralizam espécies radicais e reduzem os danos causados pelas EROs (Bilgin, 2010). A SOD promove a dismutação do radical superóxido, o qual apresenta um tempo de meia-vida relativamente curto, de menos de um segundo, em peróxido, um produto mais estável, o qual é posteriormente catalisado pela CAT e demais peroxidases (Grant & Loake, 2000).

As plantas como organismos sésseis regulam seu crescimento e desenvolvimento, por meio de estratégias, na tentativa de tolerar ambientes inóspitos, respondendo aos constantes estímulos e oscilações ambientais. Dentre as substâncias produzidas pode-se citar, os hormônios, que influenciam o crescimento, a diferenciação, a reprodução, o desenvolvimento e atuam na sinalização entre os órgãos vegetais, como eficientes mecanismos de defesa (Peleg & Blumwald, 2011).

Dentre os mecanismos de regulação aos estresses abióticos, destacam-se os hormônios vegetais, moléculas orgânicas que desempenham função de mensageiros químicos, responsáveis pela formação e crescimento de tecidos, bem como mediadoras de comunicação intercelular (Taiz & Zeiger, 2004). Com destaque ao ácido abscísico (ABA), porém, recentemente verificou-se que outros grupos hormonais (giberelinas, citocininas, etileno e auxinas) demonstram potenciais respostas e sinalização na atenuação aos danos (Qin et al. 2011).

O papel da auxina sobre as plantas já é bem caracterizado. Essa molécula é responsável por expandir a célula vegetal, atuando sobre as ligações entre as microfibrilas de celulose da parede celular, promovendo a ruptura e o aumento da plasticidade, facilitando a entrada de água nas células e aumentando suas dimensões (Castro et al. 2009), regulando o crescimento de parte área e do sistema radicular, a diferenciação dos tecidos vasculares, a formação de gemas axilares e o desenvolvimento de flores (Cato et al. 2013; Du et al. 2013). Ademais, sob estresse hídrico, permite um controle positivo da arquitetura de raiz, expressão de genes responsivos ao ABA, metabolismo das EROs e homeostase metabólica (Shi et al. 2014).

A rota biosintética da auxina pode ser dependente ou independente do aminoácido triptofano (Figura 1). A partir da desaminação deste, é biossintetizado o triptofol (Tol), composto fenólico, que submetido à ação enzimática de oxidases-desidrogenases é utilizado para a síntese de um Indol-3-acetaldeído (IAD), um precursor do indol-3-acético (AIA) (Percival et al., 1973).

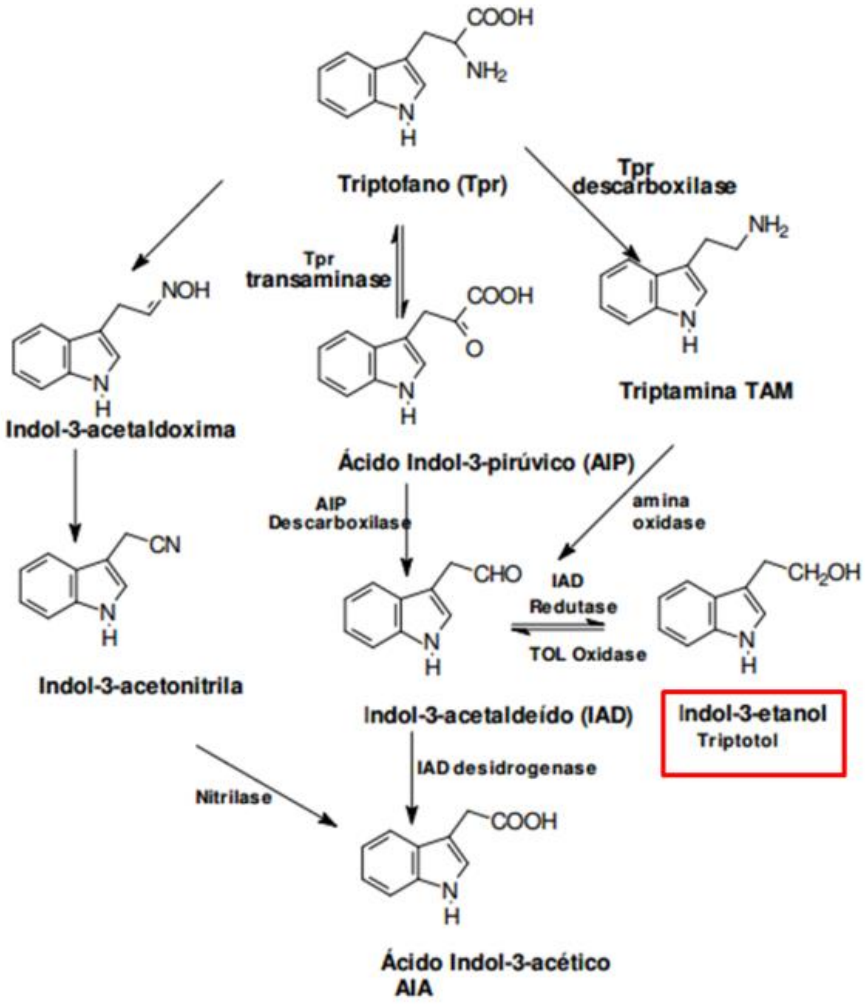


Figura 1. Rota de biossíntese do hormônio vegetal ácido indol-3-acético (AIA), adaptado de Normanly et al. 1995.

Além da potencial ação benéfica promovida pelo uso dos hormônios vegetais, existem moléculas e/ou microrganismos capazes de melhorar o desempenho de suas funções, incrementando a tolerância ao estresse abiótico e melhorando a qualidade da cultura, comumente chamados de bioestimulantes (Brown & Saa 2015; Povero et al. 2016). Na busca por moléculas bioativas, com potencial uso na agricultura, podemos

afirmar que o triptofol, composto orgânico presente em plantas, organismos marinhos, fungos e bactérias (Guzmán-López et al. 2007; Liu et al. 2006), apresenta características promissoras como bioestimulante, seu uso na cultura do feijão levou a melhorias nas concentrações de pigmentos fotossintéticos e nas trocas gasosas, bem como estimulou o crescimento de parte aérea e do sistema radicular (Nascimento et al. 2016).

Estudos envolvendo tomates (*Solanum lycopersicum* L.), mostraram que plantas submetidas à aplicação de (*Pseudomonas putida* subgrupo B estirpe 1 e *Trichoderma atroviride*) microrganismos capazes de sintetizar Tol, aumentaram significativamente a biomassa radicular e a produção de frutos (Gravel et al. 2007). Em *Arabdopsis thaliana*, observou-se que o *Trichoderma virens* produziu compostos como IAD, AIA e Tol, os quais atuam como mediadores da promoção do crescimento de plantas, inclusive alterando a arquitetura de raízes e estimulando a sinalização de resposta de resistência sistêmica e adquirida (Contreras-Cornejo et al., 2009).

Procurando moléculas que promovam a tolerância ao DH, esse trabalho objetivou avaliar o uso de duas moléculas bioativas, auxina e triptofol, como potenciais remediadores do efeito do DH em plantas de soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Condições experimentais e de crescimento de plantas

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa – *Campus* de Rio Paranaíba (19°12' 42.23" S e 46°13' 39.50" W). As temperaturas mínima e máxima aferidas durante o ensaio foram de 23 e 40 °C, respectivamente, e o conteúdo de água no solo foi mantido em, aproximadamente, 80% da capacidade de campo (CC), não permitindo o estresse hídrico antes do período de análise.

A CC foi determinada pelo método da coluna de solo (Adaptado de Fernandes & Sykes, 1968), onde no fundo de uma proveta de 1000 mL foi efetuado um pequeno furo próximo à base e inserido um papel toalha amassado. O solo (terra fina seca ao ar – TFSA) foi peneirado e adicionado à proveta, até uma altura de aproximadamente 50 cm, de forma a apresentar distribuição regular das partículas e uniformidade externa sem falhas prejudiciais ao movimento de água. No ápice da coluna foram adicionados 100 mL de água destilada, volume que não permite o movimento até o fundo da coluna, a qual foi coberta com plástico para evitar a evaporação da porção superficial. Transcorridas 48 h, a contar da adição da água, foram coletadas amostras em profundidade, em um espaço de 2 cm (entre a camada de 5 a 7 cm), determinando-se a umidade da porção (base seca). O valor de umidade, expresso em base seca calculado, correspondeu à CC do solo, sendo expresso em % (g de água/100 g de solo seco). O controle de água no solo no experimento foi realizado pelo método de pesagem dos vasos realizada diariamente.

Nos dois experimentos, 6 sementes de *G. max*, cultivar NA 5909 RG foram semeadas em vasos plásticos com capacidade para 5 dm^3 no dia 19 de outubro de 2015. Os vasos foram preenchidos com um substrato mescla de solo argiloso e arenoso (1:1), com as seguintes características químicas: pH $CaCl_2$: 5,3; M.O.: 26 g dm^{-3}; P: 8,0 mg dm^{-3}; K: 0,9 mmol dm^{-3}; Ca: 14 mmol dm^{-3}; Mg: 5,0 mmolc dm^{-3}. O qual foi peneirado e previamente corrigido para atingir saturação de bases de 70% e adubado de acordo com a necessidade da cultura (Ribeiro et al. 1999). A identificação dos sucessivos estádios fenológicos da planta de soja foi fundamentada na escala proposta por Fehr & Caviness (1977). Aos 14 dias após semeadura (DAS), quando as plantas se encontravam no estádio V1 foi realizado o desbaste homogêneo, com a permanência de 2 plantas por vaso para realização das avaliações.

Imposição do déficit hídrico e reguladores de crescimento de plantas

Os tratamentos de déficit hídrico consistiram em dois níveis de manutenção da umidade do solo. No primeiro as plantas foram mantidas em aproximadamente 80% da CC; e no segundo a disponibilidade hídrica foi reduzida em aproximadamente 20% nos vasos, até a estabilização em 60% da CC. Ambos os procedimentos foram realizados através da pesagem e irrigação diária dos vasos e a CC calculada através do método gravimétrico (Dobriyal et al. 2012). O déficit hídrico foi imposto no estádio de pleno florescimento (R2) (Fehr & Caviness 1977), quando as plantas estavam com 43 DAS, durante um período de 4 dias.

A aplicação dos reguladores vegetais foi realizada com um pulverizador manual até o escoamento, com pressão máxima de 300 kPa, uma semana antes da imposição do déficit hídrico moderado, quando as plantas se encontravam com 36 DAS, no estádio fenológico R1 (Fehr & Caviness 1977). As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: Tratamento 1 (200 mg L^{-1} de água destilada em plantas submetidas à 80% CC); Tratamento 2 (200 mg L^{-1} de Aux em plantas com 80% CC); Tratamento 3 (200 mg L^{-1} de Tol nas plantas com 80% CC); Tratamento 4 (200 mg L^{-1} de água destilada em plantas submetidas à 60% CC); Tratamento 5 (200 mg L^{-1} de Aux em plantas com 60% CC); Tratamento 6 (200 mg L^{-1} de Tol nas plantas com 60% CC).

Análises de Trocas Gasosas

Durante o estádio R2, foram analisadas as trocas gasosas das plantas, todas as mensurações ocorreram entre 9:00 e 10:30 h, com auxílio de um sistema de trocas gasosas portátil (LI-6400XT; LI-COR Inc., Lincoln, NE, EUA) equipado com um fluorímetro modulado (LCF-40 LI-COR Inc.) sob saturação de radiação fotossinteticamente ativa (Q) de 1200 μmol m^{-2} s^{-1}e o fluxo de ar de 300 μmol s^{-1}. As medições de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), transpiração foliar (E) e pressão intercelular de CO_2 (C_I) foram realizadas: 24 h (43 DAS), 48 h (45 DAS) e 72 h (47 DAS), durante o estádio de pleno florescimento (R2). Ainda foram calculadas a eficiência do uso da água fotossintética ($WUE = A / E$) e a eficiência instantânea da carboxilação (A / C).

Análises Metabólicas

Aos 47 DAS (estádio R2) e após quatro dias sob DH, foram realizadas as análises do teor de proteína total solúvel e das atividades das enzimas antioxidantes, sendo que as folhas centrais do terceiro trifólio a partir do ápice da planta foram coletadas, levadas para laboratório e maceradas em nitrogênio líquido.

Após a pulverização do material realizou-se a quantificação das proteínas totais solúveis (Bradford, 1976), e da atividade de SOD, CAT e APX. Para a extração das proteínas solúveis foram pesados aproximadamente 100 mg de tecido vegetal, o qual foi macerado em nitrogênio líquido e em seguida, com 1,5 mL de tampão Tris-HCl. O material macerado foi centrifugado durante 10 minutos a 6000 *g*. Em uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foram acrescentados 3 mL do reativo de Bradford, o qual foi agitado e deixado em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. A leitura colorimétrica da reação foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteína solúvel foi calculada a partir da curva padrão construída com albumina soro bovina (BSA). Os resultados foram expressos em miligramas de proteínas totais solúveis por grama de matéria fresca (mg PTS g^{-1} MF) (Bradford, 1976).

Para a determinação da atividade das enzimas, foi preparado o extrato enzimático bruto, pesando-se 200 mg de matéria fresca e tomando o cuidado de se anotar os valores para a efetuação de cálculos posteriores. O material vegetal fresco foi pulverizado com N líquido, contendo polivinilpolipirrolidona (PVPP) (10% 0,04 g) e posteriormente adicionou-se 1500 µL do meio de extração (750 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM e pH 7,8, ainda 15 µL de ácido etilenodiamino (EDTA) 10 mM acrescido de 150 µL de ácido ascórbico 200 mM e 585 µL de água Milli-Q). Este mix foi acomodado em gelo durante todo o processo de pulverização do material. Ademais, a alíquota do tampão de extração, foi dividida em duas de 750 µL objetivando facilitar a maceração. Logo em seguida, a amostra foi vertida em *eppendorf* de 2 mL e centrifugada a 12 000 *g* por um período de 20 minutos à 4 ºC. O sobrenadante foi coletado e armazenado em gelo até o momento das leituras.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 100 µL de extrato enzimático, a 1880 µL de uma solução contendo 2000 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8, 800 µL de metionina 70 mM, 40 µL de EDTA 10 µM, 300 µL de nitroazul de tetrazólio (NBT) 1 mM e 620 µL de H_2O Milli-Q. Foram preparados dois brancos, um

recoberto em papel alumínio utilizado para zerar o espectrofotômetro e um submetido à luz e quantificado. Estes brancos foram preparados utilizando-se 1880 μL do mix preparado para a SOD, 100 μL de água Milli-Q e 20 μL de riboflavina. A preparação do branco no escuro tem por objetivo subtrair da amostra que será iluminada no processo de redução do NBT enquanto que, o branco mantido na luz juntamente às amostras é quantificado com o objetivo de definir uma unidade de SOD relativa à quantidade de enzima necessária para inibir 50% a máxima fotorredução do NBT. A reação ocorreu em uma câmara, sob iluminação de lâmpadas fluorescente de 15 W, com exposição de 10 min. A atividade da enzima foi mensurada pela diferença no aumento da absorbância das amostras em comprimento de onda de 560 nm. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir, em 50%, a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich 1971; Gianngiopolitis & Reis 1977).

Para determinação da CAT, uma alíquota de 12,5 μL do extrato enzimático foi adicionado a 500 μL de tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 7,0 e 400 μL de H_2O Milli-Q incubados à 27 °C durante 10 min e ainda, 50 μL de H_2O_2 250 mM e 37,5 μL de H_2O Milli-Q. A atividade da enzima foi determinada pela mensuração da redução na absorbância das amostras a 240 nm, em decorrência do consumo do H_2O_2 (Havir & McHale 1987; Anderson et al. 1995). Foi procedida uma leitura cinética com duração de 60 segundos com intervalos de 10 em 10 s, sendo observado o decréscimo na absorbância. As leituras foram realizadas de forma rápida e precisa, pois o H_2O_2 desencadeia o processo de redução pela enzima ao entrar em contato com a amostra.

Já a atividade da APX, foi realizada tomando-se uma alíquota de 12,5 μL do extrato enzimático, a qual foi acrescentada a 500 μL de tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7, 50 μL de ácido ascórbico 10 mM e 350 μL de H_2O Milli-Q incubados à 27 °C durante 5 minutos, e ainda, 50 μL de H_2O_2 (2 mM) e 37,5 μL de H_2O Milli-Q. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM^{-1} cm^{-1} (Nakano & Asada 1981). A leitura assim como para CAT, também foi realizada de forma rápida e precisa evitando ao máximo o processo de redução pela enzima ao entrar em contato com a amostra. Para todas as enzimas e proteína total solúvel, a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis Evolution 300 da Thermo Scientific.

Para a quantificação de danos de membranas foram coletados 10 discos foliares, de aproximadamente 1 cm de diâmetro, e incubados em 20 mL de água destilada à 25

°C durante 24 h, em agitação leve e constante. Após esse período a condutividade elétrica do extrato (L1) foi medida utilizando-se um condutivímetro de bancada (Tecnopon mCE-105). As amostras foram fervidas a 100 °C, durante 1 h em tubos vedados, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e obteve-se a segunda leitura (L2). O extravasamento de eletrólitos (EL) foi determinado segundo Talukdar (2013), onde: EL (%) = (L1 / L2) x 100.

Análise de Pigmentos Foliares e Botões Florais das Plantas

No estádio R2, aos 46 DAS, foram coletadas folhas totalmente expandidas do terceiro trifólio, do ápice para base, de cada planta em cada tratamento, para extração dos pigmentos fotossintéticos (*Chl. a*, *Chl. b*, *Chl. Total* e *Car*). O material vegetal foi acondicionado em tubos contendo como extrator solução de acetona 80% (v/v), e mantido no escuro por 72 h (Macedo et al. 2013). Posteriormente, os extratos foram submetidos à leitura em um espectrofotômetro (SP-2000 Espectro de UV) nas absorbâncias de 470, 645 e 663 nm, para determinação de carotenoides, das clorofilas a, b e total, respectivamente (Harmut et al. 1983; Witham et al. 1971). Os valores foram utilizados para cálculos segundo as fórmulas abaixo e os resultados expressos em mg g^{-1} de pigmento no tecido foliar fresco.

$$Clorofila\ a = [(12{,}7 * A_{663} - \ 2{,}69 * A_{645}) * \frac{V}{1000 * W}$$

$$Clorofila\ b = [(22{,}9 * A_{645} - \ 4{,}68 * A_{663}) * \frac{V}{1000 * W}$$

$$Clorofila\ total = [(20{,}2 * A_{645} + \ 8{,}02 * A_{663}) * \frac{V}{1000 * W}$$

$$Carotenoides = \frac{[(1000 * A_{470} - \ 3{,}27 * Cl\ a - 104 * Cl\ b)/229]}{1000 * W}$$

No mesmo período foram contabilizados os botões florais de cada planta em todos os tratamentos, utilizando-se de um contador manual.

Matéria Seca Vegetal, Teor Mineral Foliar, Nodulação de Raízes, Massa Seca e Número de Vagens

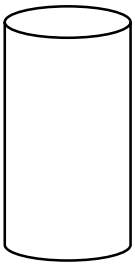
Concomitantemente ao experimento descrito anteriormente, foi conduzindo um segundo nas mesmas condições, para as análises destrutivas, visto que o primeiro havia sido desfolhado para as análises de pigmentos e metabólicas.

Aos 50 DAS, quando se encontravam no período de pleno florescimento (estádio R2), as plantas foram coletadas, separadas em parte aérea e raiz. O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar por 72 h a 70 °C, onde procedeu-se a pesagem para obtenção da massa seca da parte aérea. Em seguida as folhas foram trituradas e homogeneizadas para estimar os teores dos nutrientes: potássio, sódio, cálcio e magnésio. A análise foi realizada via digestão nítrico-perclórica, utilizando três repetições para cada tratamento.

Foram pesados 0,3 g de tecido vegetal e adicionados 5 mL da mistura de ácidos digestores (200 mL de ácido perclórico e 600 mL de ácido nítrico). Foi realizada uma pré-digestão para que o tecido vegetal entrasse em contato com o ácido nítrico. Então, os tubos foram levados ao bloco digestor a uma temperatura de ± 95 ºC. Quando a matéria orgânica estava parcialmente digerida e o volume do ácido reduzido à metade, a temperatura foi gradativamente aumentada até ± 150 ºC. Assim que o extrato se tornou claro, a temperatura foi reduzida para 120 ºC e adicionou-se 30 mL de água destilada lentamente, obtendo um volume final de aproximadamente 31,25 mL, procedendo a agitação em vórtex. Para o potássio foram adicionados 0,2 mL do extrato nítrico-perclórico mais 9,8 mL de água destilada, procedida a agitação e leitura em fotômetro de chama. Enquanto que para o sódio procedeu-se a leitura direta no extrato nítrico-perclórico, também em fotômetro de chama.

Para as leituras de cálcio e magnésio foram utilizadas soluções-padrão de 1000 mg L^{-1} de Ca e 80 mg L^{-1} de Mg. Assim, foram pipetados 100 mL do padrão misto (1000 ppm de Ca e 80 ppm de Mg) e completados para 1 L de água. Também foi acrescida solução contendo uma concentração de 16000 ppm de estrôncio (Sr). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,2 mL de extrato nítrico-perclórico, mais 17,8 mL de água destilada e 2 mL da solução 16000 ppm de Sr. Foi procedida a agitação e leitura em espectrofotômetro de absorção atômica

As raízes das plantas aos 50 DAS (estádio R2) foram lavadas cuidadosamente em água corrente, para a remoção de solo e detritos e, secas em papel toalha. A contagem do número de nódulos na raiz principal foi realizada considerando um cilindro imaginário, abaixo do colo radicular da planta (nível do solo), de aproximadamente 2,5 cm de diâmetro por 5 cm de altura.



5 cm

2,5 cm

Aos 107 DAS (estádio R8) foram quantificados o número e a massa de vagens. Foram colhidas duas plantas por vaso, das quais foram tomadas médias. A massa foi aferida utilizando-se uma balança de bancada e assim como para o número de vagens foram tomadas as médias, considerando-se o fato de serem duas plantas.

Análises Estatísticas

O experimento foi conduzido em bloco inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2x3, sendo os fatores: duas condições hídricas (60 e 80% CC) e três níveis de tratamento (água, Aux e Tol). Para as variáveis: nodulação, botões florais, número e massa de vagens e parâmetros fisiológicos foram utilizadas 5 repetições (n=5), enquanto que para as análises de proteína solúvel, vazamento de eletrólitos, pigmentos, enzimas antioxidantes e nutrientes foram utilizadas 3 repetições (n=3).

O modelo matemático utilizado foi: $\hat{y}_{ij} = \mu + H_i + C_j + HC_{ij} + e_{ij}$, onde: $\hat{y}_{ij}$ é o efeito do tratamento i na repetição j, μ é a constante associada a todas as observações; H_i o efeito do tratamento hídrico i, com i = 1, 2 e 3; C_j = o efeito das aplicações j, com j = 1, 2 e 3; HC_{ij} = o efeito da interação entre o tratamento hídrico i e as aplicações j e e_{ij} corresponde ao erro experimental associado a Y, independente, que por hipótese, apresenta distribuição normal com média zero e variância σ^2.

As médias foram submetidas a análise de variância (ANOVA), e posteriormente as médias dos tratamentos foram submetidas à análise de comparação múltipla pelo teste da diferença mínima significativa (LSD) e diferenças em $p<0,05$ foram

consideradas significativas. Houve necessidade de transformação de *Box-Cox* dos dados em $\sqrt{\bar{x}}$ para as análises de: *A* (início da imposição do déficit hídrico), C_I (72 h após imposição do déficit hídrico), *C/A* (48 e 72 h), *E* (início do estresse) e *WUE* (início, após 48 e 72 h do estresse). Utilizamos o software R (R Core Team 2015) para realizar as análises estatísticas.

3. RESULTADOS

Análise de pigmentos e de trocas gasosas

Após o período de estresse (46 DAS), quando as plantas encontravam em pleno florescimento (estágio R2) notou-se que o teor médio de *Chl. a, b, total* e carotenoides não diferiram significativamente entre os tratamentos (Tabela 1). Enquanto que as plantas com déficit hídrico moderado (60% CC) apresentaram um decréscimo significativo (Tabela 2), em comparação as plantas controle.

Tabela 1. Pigmentos fotossintéticos, 72 h após a imposição de estresse moderado (60% CC) e assimilação líquida de CO_2 (*A*), 24 e 48 h após a imposição, submetidos aos tratamentos: água, Aux e Tol.

	Pigmentos (mg g^{-1} MF^{-1})				*A* (µmol m^{-2} s^{-1})	
Tratamentos	*Chl. a*	*Chl. b*	*Chl. total*	*Car.*	24 h	48 h
Água	2,22 (±0,13) a	0,67 (±0,05) a	3,04 (±0,18) a	0,06 (±0,00) a	15,99 (±1,56) a	10,11 (±1,04) a
Aux	1,82 (±0,25) a	0,68 (±0,09) a	2,49 (±0,34) a	0,05 (±0,01) a	15,83 (±1,71) a	12,83 (±1,99) a
Tol	1,80 (±0,18) a	0,67 (±0,07) a	2,47 (±0,24) a	0,05 (±0,01) a	16,32 (±1,22) a	12,37 (±1,49) a

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Valores médios dos teores de clorofila a (*Chl. a*), clorofila b (*Chl. b*), clorofila total (*Chl. total*), carotenoides (*Car*) e assimilação líquida de CO_2 (*A*), nas capacidades de campo impostas às plantas de soja.

	Pigmentos (mg g^{-1} MF^{-1})				*A* (µmol m^{-2} s^{-1})	
CC (%)	*Chl. a*	*Chl. b*	*Chl. total*	*Car*	24 h	48 h
60	1,65 (±0,16) b	0,62 (±0,06) b	2,27 (±0,23) b	0,05 (±0,00) b	16,70 (±0,93) aA	9,96 (±0,93) bA
80	2,25 (± 0,07) a	0,82 (±0,03) a	3,07 (±0,10) a	0,07 (±0,00) a	15,39 (±1,42) aA	13,57 (±1,41) aA

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação às trocas gasosas, observamos que a *A* apresentou redução em todos os tratamentos 24 e 48 h após a imposição do estresse nas plantas de soja. Entretanto, na

condição bem irrigada o tratamento com Tol se mostrou significativamente duas vezes melhor que a auxina após 72 h de estresse (Tabela 3). No terceiro dia de imposição do déficit hídrico foi possível observar, que a assimilação líquida de CO_2 de plantas submetidas ao tratamento com auxina, se mostrou significativamente superior em relação ao Tol nas plantas submetidas ao estresse (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios das interações significativas relacionadas à assimilação líquida de CO_2 (*A*), mensurados no terceiro dia (72 h após a imposição do déficit hídrico), em plantas submetidas aos tratamentos com os reguladores e aos dois níveis de capacidade de campo.

Tratamento	*A* (µmol $m^{-2}s^{-1}$)	
	CC (%)	
	60	80
Água	13,91 (±2,05) Aa	8,91 (±2,09) Aa
Aux	14,02 (±2,39) Aa	16,04 (±3,38) Aa
Tol	7,35 (±1,64) Ba	14,64 (±2,60) Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade.

Para os demais parâmetros de trocas gasosas, g_s, C_I, *A/C* e *E*, *WUE* não foram observados efeitos significativos da capacidade de campo ou das doses dos reguladores.

Análises Metabólicas

A quantidade de proteína solúvel total, não diferiu estatisticamente entre os reguladores e os níveis de restrição hídrica (Tabela 7). O tratamento com 60% CC mostrou significativamente mais dano de membrana do que no tratamento bem irrigado (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios referentes à proteína total solúvel (PTS) e danos às membranas (DM) das folhas de soja submetidas aos tratamentos com reguladores e duas capacidades de campo.

Tratamento	PTS (mg proteína g^{-1} MF)	DM (%)
Água	3,80 (±0,21) a	9,32 (±1,60) a
Aux	3,56 (±0,26) a	6,87 (±0,56) a
Tol	4,03 (±0,28) a	7,68 (±0,93) a
CC (%)		
60	3,82 (±0,26) a	9,69 (±0,99) a
80	3,77 (±0,13) a	6,23 (±0,31) b

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade.

Não verificou-se diferença estatística nas atividades de SOD e APX entre os tratamentos com os reguladores. No entanto, para a CAT os tratamentos com auxina e água apresentaram-se significativamente uma maior atividade, tendo o uso do Tol demonstrado menor valor para CAT (Tabela 5). As atividades das enzimas antioxidantes também não apresentaram diferença significativa nos dois níveis de irrigação avaliados.

Tabela 5. Valores médios referentes às enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) das plantas de soja submetidas aos tratamentos com reguladores e dois níveis de capacidade de campo.

Tratamento	Enzimas Antioxidantes		
	SOD (U min^{-1} mg^{-1} proteína)	CAT (umol min^{-1} mg^{-1} proteína)	APX (umol min^{-1} mg^{-1} proteína)
Água	1,70 (±0,18) a	150,73 (±26,79) ab	0,28 (±0,4) a
Aux	1,98 (±0,37) a	328,32 (±43,88) a	0,22 (±0,01) a
Tol	1,74 (±0,15) a	81,27 (±10,15) b	0,17 (±0,02) a
CC (%)			
60	1,91 (±0,23) a	157,32 (±33,63) a	0,24 (±0,02) a
80	1,70 (±0,17) a	216,23 (±25,21) a	0,21 (±0,02) a

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade.

Análise reprodutiva da planta

Após imposição do déficit hídrico moderado (60% CC), a utilização de Tol dentro de 80% CC de água no solo apresentou um menor número de botões florais (Tabela 6). Entretanto, em 60% CC a auxina foi significativamente maior para o número de botões florais em relação ao Tol, tendo o estresse reduzido o número de botões florais em ambos os tratamentos (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios das interações significativas, relativa aos números de botões florais das plantas de soja submetidas aos tratamentos com reguladores e dois níveis de capacidade de campo.

	Botões Florais (número por planta)	
Tratamento	CC (%)	
	60	80
Água	50,4 (±3,69) Ba	71,2 (±3,58) Aa
Aux	55,4 (±1,43) Aa	45,2 (±5,68) Ab
Tol	44,8 (±3,77) Ba	61,4 (±0,86) Aa

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna (dose dentro dos níveis de capacidade de campo) e maiúscula na linha (capacidade de campo dentro dos níveis de dose), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade.

Matéria seca da planta, nodulação das raízes e teor mineral foliar

Não houve diferença significativa entre os tratamentos com os reguladores nos parâmetros massa seca de parte aérea, massa seca de raiz e massa seca de vagem (Tabela 7). Entretanto, para a análise de nodulação e número de vagens, a auxina demonstrou-se superior em relação ao uso de Tol. Houve significativa redução dos parâmetros número de vagens e massa seca de vagens após a imposição do déficit hídrico de 60% CC (Tabela 7).

Tabela 7. Valores médios referentes à massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN), número de vagens (NV) e massa seca de vagens (MSV) de plantas de soja submetidas aos tratamentos com reguladores e dois níveis de capacidade de campo (CC).

Tratamento	MSPA (g)	MSR (g)	NN	NV	MSV (g)
Água	11,35 (±0,64) a	6,76 (±0,86)a	48,5 (±6,15) a	14,6 (2,14) a	7,07 (2,80) a
Aux	9,87 (±0,52) a	5,95 (±0,74) a	42,6 (±3,35) ab	16,6 (1,14) a	6,07 (2,89) a
Tol	10,89 (±0,91) a	7,24 (±0,77) a	32,6 (±3,88) b	11,5 (1,65) b	6,04 (2,26) a
CC (%)					
60	10,07 (±0,65) a	6,50 (±0,63) a	40,33 (±3,59) a	12,27 (1,87) b	5,22 (3,23) b
80	11,34 (±0,40) a	6,81 (±0,60) a	42,13 (±4,22) a	16,20 (1,42) a	7,56 (2,07) a

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade.

Não houve diferença entre os teores de K, Ca, Na e Mg nas plantas submetidas aos diferentes reguladores (Tabela 8). O mesmo foi observado nos tratamentos com diferentes níveis de irrigação, com exceção do Na que aumentou significativamente em plantas submetidas a 60% CC (Tabela 8).

Tabela 8. Valores médios de teor de nutrientes das plantas de soja submetidas aos tratamentos com reguladores e dois níveis de capacidade de campo (CC).

	($g\ kg^{-1}$)			
Tratamento	K	Ca	Na	Mg
Água	8,66 (±1,69) a	16,74 (±0,22) a	6,34 (±0,13) a	5,26 (±0,02) a
Aux	7,50 (±1,21) a	15,95 (±0,09) a	6,25 (±0,14) a	4,79 (±0,01) a
Tol	10,36 (±1,59) a	14,66 (±0,16) a	6,68 (±0,13) a	5,01 (±0,01) a
CC (%)				
60	8,99 (±1,49) a	15,15 (±0,13) a	7,23 (±0,10) a	4,66 (±0,01) a
80	8,68 (±1,04) a	16,42 (±0,13) a	5,61 (±0,05) b	5,38 (±0,01) a

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste LSD ao nível de 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

A diminuição dos pigmentos fotossintetizantes nos tratamentos sob déficit hídrico varia de acordo com a espécie, mas tende a ser reduzido em função da sua acelerada degradação sob essa condição hídrica (Nankishore & Farrel, 2016). Essa resposta metabólica se dá pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são responsáveis por danificar e reduzir a funcionalidade dos cloroplastos (Jaleel et al. 2009).

Como esperado o déficit hídrico resultou em diminuição da assimilação líquida de CO_2, a qual foi significativamente afetada três dias após a imposição deste. A planta em resposta a um período de restrição hídrica tende a reduzir a condutância estomática, como um mecanismo limitante de perda de água, porém isso diminuiu a assimilação de CO_2 (Nankishore & Farrell, 2016). Hayat et al. (2009) avaliando IAA, 4-Cl-IAA e IBA, em grão de bico, observaram melhorias na assimilação de carbono pelas plantas. Isto deve-se as reações de ligação envolvendo a enzima 1,5-bifosforibulose, além de síntese de açúcares redutores, fosforilação fotossintética e biossíntese de clorofilas (Qi et al. 2013).

A auxina quando ligada ao seu receptor de membrana ABP1, ativa bombas de H^+, resultando numa redução do pH apoplástico, acidificação da parede, ativação de hidrolases e expansinas. As quais, por sua vez, devido à quebra de pontes hidrogeniônicas entre celulose e hemicelulose, ocasionam o deslizamento das microfibrilas promovendo o afrouxamento da parede, permitindo assim o alongamento celular (Tena, 2016). Com o aumento do turgor celular ocorre uma maior abertura estomática melhorando a assimilação de CO_2 pela Rubisco em decorrência de uma maior difusão de CO_2 pelo mesofilo foliar, permitindo um melhor desempenho fotossintético (Chaves et al. 2009). No entanto, no presente estudo o tratamento com Aux não diferiu do controle em relação ao parâmetro *A*, nos tempos avaliados.

Por ser o Tol um precursor da auxina, ambos derivados da síntese a partir do aminoácido triptofano, ponderamos que este tratamento apresentou respostas semelhantes ao tratamento com auxina, pois a planta pode estar utilizando sua estrutura química para regular o suprimento do tecido com auxina. Nascimento et al. (2016) estudando respostas fisiológicas de feijoeiro submetidos a Tol sugeriram que estas podem apresentar interferências na fase fotoquímica da fotossíntese, resultando em melhor desempenho fotossintético das plantas. Havendo uma redução hídrica, ocorre

também uma diminuição na assimilação de carbono, ocorrendo ainda redução do uso eficiente de água, pois esta é proporcional às oscilações fotossintéticas. Entretanto, o uso de Tol permitiu melhoria no uso eficiente da água, provavelmente devido seu efeito auxínico.

Condições de déficit hídrico desestabilizam a cadeia de transporte de elétrons, levando a produção de espécies reativas de oxigênio, tóxicas às plantas, dentre eles: superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais são responsáveis pela oxidação lipídica, provocando alteração e danos de membrana (Chang et al. 2016). A manutenção da integridade das membranas celulares é prejudicada devido à formação dos radicais livres, responsáveis por um maior extravasamento de eletrólitos quando em condição de restrição hídrica, devido ao aumento dos danos nas membranas (Fioreze et al. 2013). Esse fato deve-se a maior plasticidade das membranas, assim evitando o rompimento das mesmas. Sabe-se que o crescimento e alongamento promovido pela auxina é devido a acidificação apoplástica. Esta ainda está envolvida na indução dos processos de fosforilação de sítios e de fosfatases, os quais participam dos processos de expansão celular em decorrência do afrouxamento de membranas (Haruta et al. 2015).

Durante períodos de déficit hídrico é comum as plantas ativarem seus mecanismos de defesa, dentre eles as enzimas antioxidantes, com destaque para: superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, as quais são responsáveis por atenuar os efeitos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) (Maia et al. 2012). O uso de Aux favoreceu a atividade de CAT, em relação ao triptofol, resultado que corrobora com aqueles inferidos para a redução dos danos de membranas. Cabe salientar que a CAT é a enzima responsável por decompor H_2O_2 em H_2O e O_2 nas células vegetais quando submetidas à estresse (Saed-Moucheshi et al. 2014), e o aumento de sua atividade indica uma superprodução do substrato (H_2O_2) nos tecidos de soja sob estresse.

As plantas submetidas ao estresse apresentaram menor número de botões florais, devido à abscisão floral como resposta ao déficit hídrico imposto. Nas plantas a aplicação de auxina foi responsável pelo maior número de botões florais em relação ao uso do Tol tanto sob 60 e 80% CC. Resposta, esperada pois o AIA é a auxina endógena, predominantemente envolvida no desenvolvimento embrionário e pós-embrionário,

influenciando na divisão, expansão polar e diferenciação celular (Teale et al. 2006), bem como na indução de florescimento (Leopold & Thimann, 1949).

O uso de Tol pode ser interessante para plantas submetidas à períodos de déficit hídrico. Pois quando neste estado, a planta diminui a expansão principalmente aérea de modo a economizar água e diminuição de MSR ao longo do período de restrição hídrica. Como o Tol atua como um tampão na síntese de auxina, acreditamos que esta molécula está envolvida nos processos de regulação do crescimento celular.

A redução do número de vagens e massa seca de vagens após a imposição do déficit hídrico deve-se em decorrência do elevado índice de abortamento de botões florais e ainda a redução na translocação pela deficiência hídrica. A soja, principalmente, o material genético avaliado (NA 5909 RG) apresentou-se muito exigente em recursos hídricos, os quais se elevam progressivamente com o desenvolvimento da cultura, até a demanda máxima durante o florescimento e formação de vagens. O déficit hídrico afeta negativamente a quantidade de massa produzida, assim como o tamanho de grãos e sua respectiva massa, sendo esses efeitos decorrentes da seca sobre a fotossíntese e consequente, restrição da disponibilidade de fotoassimilados (Mundstock & Thomas 2005). Entretanto, com o uso de auxina o número de vagens apresentou-se superior em relação ao uso do Tol, em razão da relação temporal metabólica da planta. A auxina em si é essencial ao processo de alongamento celular (Marschner, 1995) e apresenta eficiência em relação ao Tol, que é um precursor auxínico. O uso de auxina também permitiu uma maior nodulação em relação ao uso do Tol, pois esta atua diretamente na formação de nódulos em leguminosas, controlando a viabilidade de nodulação.

Em plantas sob estresse hídrico, a presença de íons potássio e sódio em maiores concentrações deve-se às maiores concentrações de solutos e menores potenciais osmóticos na célula vegetal. O potássio atua diretamente no ajustamento osmótico, permitindo que as plantas preservem maior conteúdo de água em seu interior, reduzindo os danos causados aos processos fisiológicos: assimilação líquida de CO_2, condutância estomática, turgor celular, síntese de proteínas, atividades hormonais e enzimáticas. O sódio desempenha importante papel na preservação do potencial hídrico da planta, pois este atua como soluto osmoticamente ativo, além de estimular o crescimento aumentando a expansão celular (Marschner, 1995).

A auxina promove alterações no potencial de membrana devido a oscilações de pH em função do fluxo de íons, o que é totalmente correlacionado à concentração de K^+. É relatado que a aplicação de auxina nas plantas ativa bombas de prótons, aumentando o fluxo de H^+ e de K^+ (Zhang et al. 2016). O potencial de membrana das células são dependentes das proporções de potássio intra e extracelular, assim como do pH e ATP, os quais dependem da atividade de transporte de prótons. O aumento do pH permite um potencial de membrana mais negativo, enquanto que maiores concentrações de K^+ ameniza as alterações causadas pelo pH. Zhang et al. (2016) observaram que a concentração de auxina a partir de 10^{-6} M pode promover uma alteração no potencial de membrana, em segundos. Após a aplicação de auxina ocorre a ativação do fluxo de prótons e potássio nas células vegetais, por meio de bombas, as quais determinam o potencial de membrana, sendo essa ativação proporcionada por estímulos químicos. Por se caracterizar como um fraco ácido orgânico, a auxina leva a uma alteração do pH, devido acidificação, provocando o fluxo de prótons.

O uso de Aux pode ser considerado interessante, desde que, este nutriente está diretamente envolvido no processo de sinalização sob condições de estresse, atuando sobre a homeostase celular (Turkan & Demiral, 2009). Ainda, este nutriente foi reduzido com o déficit hídrico. Normalmente, quando há um aumento na concentração de Na^+ no citosol é passível de ocorrência de alterações na absorção e até mesmo metabolismo de Ca, devido ao fato deste último ser substituído pelo Na^+ nas membranas celulares modificando sua permeabilidade (Rengel, 1992). Houve decréscimo no conteúdo de magnésio, concomitantemente com os teores de clorofila. Sendo que este elemento mineral faz parte da estrutura da molécula de clorofila, sendo constituinte central dos complexos de porfirina (Streit et al. 2005). A clorofila está intimamente associada à assimilação de CO_2, visto que a mesma, em seu menor estado de energia absorve energia luminosa através de fótons, os quais impulsionam a fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2004). Diante disso, a diminuição do nutriente central da molécula de clorofila, implica consequentemente em redução fotossintética.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados discutidos acima, podemos inferir que os reguladores testados, em especial a auxina, induzem respostas fisiológicas se tratando de mecanismos atenuadores do efeito do estresse hídrico nas plantas de soja nos parâmetros botões florais e nodulação. Os demais parâmetros sofreram maior interferência da condição de estresse do que dos bioativadores, confirmando a sensibilidade das plantas à seca. O estádio de desenvolvimento pode ter sido um fator relevante, sob a resposta dos bioativadores no combate aos danos do déficit hídrico

6. LITERATURA CITADA

Anderson MD, Prasad TK, Stewart TR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyl of maize seedlings. Plant Physiol 109:1247-1257

Beauchamp C, Fridovichi I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 44:276-287

Bilgin DD (2010) ROS, oxidative stress and engineering resistance in higher plants. Science Publishers, 205-227. doi: 10.1201/9781439854082-11

Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72:248-254

Brown P, Saa S (2015) Biostimulants in agriculture. Front Plant Sci, 6(671):1-3. doi:10.3389/fpls.2015.00671

Castro PRC, Serciloto CM, Pereira MA, Rodrigues JLM, Rossi G (2009) Agroquímicos de controle hormonal, fosfitos e potencial de aplicação dos aminoácidos na agricultura tropical. ESALQ-Divisão de biblioteca e documentação: Piracicaba, p. 83

Cato SC, Macedo WR, Peres LEP, Castro PRC (2013) Sinergism among auxins, gibberellins and citokinins in tomato cv. Micro-Tom. Hortic Bras, 31:549-553. doi: 10.1590/S0102-05362013000400007

Cattivelli L, Rizza F, Badeck F, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Francia E, Mare C, Tondelli A, Stanca AM (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. Field Crop Res 105:1-14. doi:10.1016/j.fcr.2007.07.004

Chang Z, Liu Y, Dong H, Teng K, Han L, Zhang, X (2016) Effects of cytokinin and nitrogen on drought tolerance of creeping bentgrass. Plos One 3-19. doi:10.1371/j.po.0154005

Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Annals of Botany 103:551-560. doi: 10.1093/aob/mcn125

Companhia nacional de abastecimento – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. Grãos, nono levantamento. Brasília. ISSN 2318-6852, v. 4, p. 1- 162, 2017

Contreras-Cornejo HA, Macias-Rodriguez L, Cortes-Penagos C, Lopez-Bucio J (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enahances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabdopsis*. Plant Physiology, 149:1579-1592

Dobriyal P, Qureshi A, Badola R, Hussain AS (2012) A review of the methods available for estimating soil moisture and its implications for water resource management. J Hydrol 458-459:110-117. doi: 10.1016/j.jhydrol.2012.06.021

Du H, Liu H, Xiong L (2013) Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. Front Plant Sci 4(397):1-10. doi: 10.3389/fpls.2013.00397

Faghani E, Gharechahi J, Komatsu S, Mirzaei M, Khavarinejad RA, Najafi F, Farsad LK, Salekdeh GH (2015) Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance. Journal of Proteomics 114:1-15. doi.10.1016/j.jprot.2014.10.018

Fehr WR, Caviness CE (1977) Stages of soybean development. Ames: Iowa State University (Special Report, 80) 12

Fernandes B, Sykes DJ (1968) Capacidade de campo e retenção de água em três solos de Minas Gerais. R. Ceres, 15:1-39

Fioreze SL, Rodrigues JD, Carneiro JPC, Silva, AA, Lima, MB (2013) Fisiologia e produção da soja tratada com cinetina e cálcio sob déficit hídrico e sombreamento. Pesq Agropec Bras 48:1432-1439

Gianngiopolitis I, Reis SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higer plants. Plant Physiol 59:309-314

Grant JJ, Loake GJ (2000) Role of active oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. Plant Physiol. 124:21-29

Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2007) Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry, 39:1968-1977

Guzman-López O, Trigos A, Fernández FJ, de Jesús, Yañez-Morales M, Saucedo-Castaneda G (2007) Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adipose*. World J Microb Biot, 23:1473–1477. doi: 10.1007/s11274-007-9392-9

Haruta M, Gray WM, Sussman MR (2015) Regulation of the plasma membrane proton pump (H^+-ATPase) by phosphorylation. Current Opinion in Plant Biology 28:68-75

Hayat Q, Hayat S, Ali B, Ahmad A (2009) Auxin analogues and nitrogen metabolism, photosynthesis and yield of chickpea. Journal of Plant Nutrition 32:1469-1485

Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. Plant Physiol 84:450-455

Hossain MM, Liu X, Qi X, Lam H, Zhang J (2014) Differences between soybean genotypes in physiological response to sequential soil drying and rewetting. The Crop Journal 02:366-380. doi:10.1016/j.cj.2014.08.001

Harmut K, Lichtenthaler H, Wellburn A (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochem Soc T 11:591-592

Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, Somasundaram R, Vam RP (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. Int J Agric Bio 11:100-105

Leopold AC, Thimann KV (1949) The effect of auxin on flower initiation. American Journal of Botany 36(4):342-347

Liu Y, Jung JH, Zhang S (2006) Indole alkaloids from a sponge *Sarcotragus* species. Biochem Syst Ecol 34:453-456

Macedo WR, Kitahara DK, Castro PRC (2013) Unravelling the physiologic and metabolic action of thiamethoxam on rice plants. Pestic Biochem Phys 107:244-249

Maia JM, Ferreira-Silva SL, Voigt EL, Macedo CEC, Ponte LFA, Silveira JAG (2012) Atividade de enzimas antioxidants e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. Acta Botan Bras 26(2):342-349

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plant. Academic Press 889 (paperback)

Mundstock CM, Thomas AL (2005) Soja – Fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos. Catalogação Internacional na Publicação: Evangraf 31p

Nakano Y, Asada K (1981) Hidrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol 22:867-880

Nankishore A, Farrell AD (2016) The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. J Plant Physiol 202:75-82. doi: 10.1016/j.plph.2016.07.006

Nascimento ALV, Macedo WR, Silva GH, Almeida Neto RG, Mendes MG, Marchiori PER (2016) Physiological and agronomical responses of common bean subjected to tryptophol. Ann Appl Biol 168:195-202

Naser V, Shani E (2016) Auxin response under osmotic stress. Plant Mol Biol (ahead of print)

Normanly J, Slovin JP, Cohen JD (1995) Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. Update on Hormones 107:323-329

Peleg Z, Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. Current Opinion in Plant Biology 14:290-295. doi: 10.1016/j.pbi.2011.02.001

Percival FW, Purves WK, Vickery LE (1973) Indole-3-ethanol oxidase, kinectics, inhibition and regulation by auxins. Plant Physiol, 51:739-743

Povero G, Mejia JF, Tommaso DD, Piaggesi A, Warrior P (2016) A systematic approach to discover and characterize natural plant biostimulants. Frontiers in Plant Science 7:1-9. doi: 10.3389/fpls.2016.00435

Qi R, Gu W, Zhang J, Hao L, Zhang M, Duan L, Li Z (2013) Exogenous diethyl aminoethyl hexanoate enhanced growth of corn and soybean seedlings through altered photosynthesis and phytohormone. Australian Journal of Crop Science 7(13):2021-2028

Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance 52(9): 1569–1582. doi: 10.1093/pcp/pcr106

Queiroz LN (2014) Transformação genética de soja [*glyicine max* (L.) merrill] para expressão do gene *hahb11* relacionado à tolerância a estresses abióticos. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, p. 42

R CORE TEAM (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/

Rengel Z (1992) The role of calcium in salt toxicity. Plant Cell Environment 15:625-632. doi: 10.1111/j.1365-3040.1992.tb01004.x

Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez V, VH (1999) Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5 aproximação. Comissão de fertilidade do solo do estado de Minas Gerais 259p.

Saed-Moucheshi A, Pakniyat H, Pirasteh-Anosheh H, Azooz MM (2014) Role of ROS as signaling molecules in plants. Antioxidant Networks and Signaling 585-620. doi: /10.1016/B978-0-12-799963-0.00020-4

Shi, Chen L, Ye T, Liu X, Ding K, Chan Z (2014) Modulation of auxin content in Arabidopsis confers improved drought stress resistance. Plant Phyisiol Biochem 82:209-217

Streit NM, Canterle LP, Canto MW, Hecktheuer LHH (2005) The Chlorophylls. Ciência Rural 35:748-755

Taiz L & Zeiger E (2004) Fisiologia Vegetal, 3:449-482, Ed., Artmed

Talukdar D (2013) Arsenic-induced oxidative stress in the common bean legume, *Phaseolus vulgaris* L. seedlings and its amelioration by exogenous nitric oxide. Physiol Mol Biol Plants 19:69-79

Teale WD, Paponov IA, Palme K (2006) Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. Nat Rev Mol Cell Bio 7:847-859

Tena G (2016) Auxin signaling: Grass on acid. Nature Plants 2:16087. doi: 10.1038/nplants.2016.87

Turkan I & Demiral T (2009) Recent developments in understanding salinity tolerance. Environmental and Experimental Botany 67:2-9. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.05.008

Witham FH, Blaydes DF, Devlin RM (1971) Experiments in plant physiology. D. Van Nostrand 55-58

Zhang S, Boer AH, Duijn BV (2016) Auxin effects on ion transport in *Chara corallina*. Journal of Plant Physiology 193:37-44. doi: 10.1016/j.jplph.2016.02.009